

KJ2050 Analytisk kjemi, GK

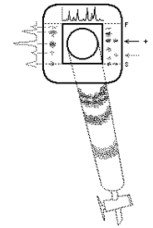
Kromatografi

(Analytiske separasjoner og kromatografi)

1. Innledning (og noe terminologi)
2. Noe generell teori
 - A. Retensjonsparametre
 - B. Sonespredning**
 - C. Sonespredningsmekanismer
3. Korte innføringer til spesifikke teknikker
 - A. Væskekromatografi (*Liquid Chromatography*, LC)
 - B. Gasskromatografi (*Gas Chromatography*, GC)
4. Kromatografi i analyser

2. (Noe generell) Teori

A. Douglas C. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R. Crouch: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 8th Ed., 2004.
Sider 920 - 1003 -- Kapitler 30E, 31, 32, 33B.



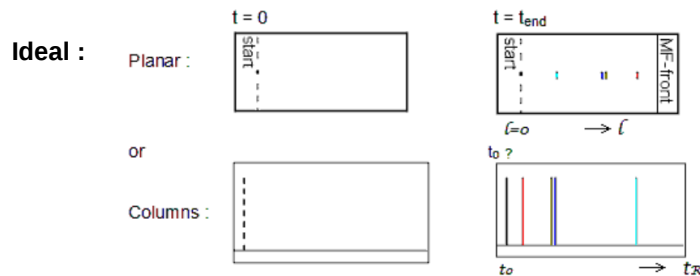
Teorien uttrykker (gjengir, forutsier) resultater fra kromatografi i grunnleggende prinsipper, og gjør det (helst) numerisk :

Teorien kan deles opp i :

- **A** : retensjonsparametere
 - hvor langt, hvor raskt vandrer stoffet ?
- **B** : sonespredning
 - hvor samlet holder stoffet seg ?
 - hvor brede / smale blir toppene (flekkenene) ?
- **C** : faktorer, prosesser som forårsaker sonespredning
 - Hva er årsaken til spredningen
 - Modeller og kvantifisering, bl.a. Den forenklede VAN DEEMTER ligning)

2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning (eng. *Band broadening*)

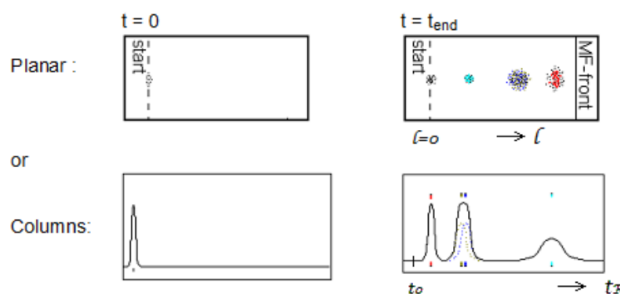


Vårt Ønske :
minst mulig spredning !!!

Minst mulig overlapping av
topper (soner, bånd)
⇒ lettere sikrere identifisering
og kvantifisering.

REALITET :

"toppene" (el. flekkene)
= sonene med analytter
sprer seg, utvider
seg under elueringen.



A.D.C.Skoog & al. : F.o.An.Ch. 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.

2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

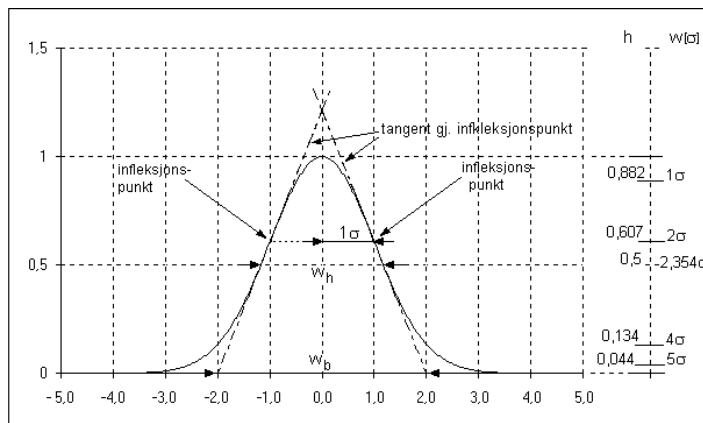
2. B. 1. Ideal kromatografisk topp

Ideal kromatografisk topp

= Gauss- eller **Normalfordelingskurve** ("klokke"-kurve) :

$$y = h_{\max} \cdot e^{-\left\{ \frac{1}{2} \frac{(x - \bar{x})^2}{\sigma^2} \right\}}$$

Forutsetning : konstant fordelingskoeffisient K_c , K_g ,
lineær (fordelings-)isoterm for fasefordelingprosessen



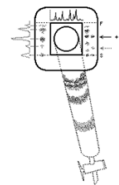
A.D.C.Skoog & al. : F.o.An.Ch. 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32, 33B.

y-akse: stoffmengde
= detektor-respons;
enhet: $h_{\max}$ (= maks. topphøyde)

'Infleksjonspunkt' =
vendepunkt(er) av kurven

For definisjon av w_b og w_h se
neste side.

x-akse : $(x - \bar{x})$
= avstand fra gjennomsnittlig $\bar{x}$
(toppmaksimum);
enhet : s (standardavvik)

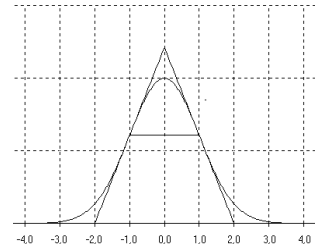


2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

2. B. 1. Ideal kromatografisk topp

= Gauss- eller Normalfordelingskurve ("klokke"-kurve):



Normalfordelingskurve fordi - molekylene til analytten har ikke alle den "sanne" retensjonstiden t_R (eller L_X , eller V_R) :

Avviket ($x - \bar{x}$) fra $\bar{x}$ er tilfeldig (stokastisk) og hyppigheten av avvikene er "normalfordelte", følger en Normalfordeling

➔ Normalfordelings-, Gauss-, "klokke"-kurve

$\bar{x}$ = gjennomsnittlig, eller "sann", vandringslengde L_X (eller retensjonstid $t_R(x)$, eller retensjonsvolum $V_R(x)$) for stoffet X.

= midten av flekken, toppen

= x ved det høyeste punkt av toppen.

"Statistiske mål" kan brukes for å beskrive - kvantifisere - en (ideal) **toppbredde** :

- varians (σ^2) eller
- standardavvik (σ).

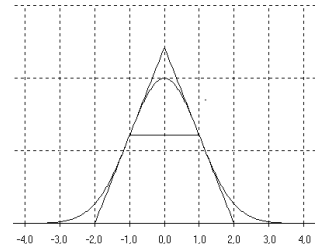
A.D.C.Skoog & al. : *F.o.An.Ch.* 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32, 33B.

2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

2. B. 1. Ideal kromatografisk topp

= Gauss- eller Normalfordelingskurve ("klokke"-kurve):



Spesielle egenskaper/karakteristika for "Gauss-toppen"
og sammenheng mellom ulike mål for topp-bredden :

$$y = h_{\max} \cdot e^{-\left\{\frac{1}{2} \frac{(x-\bar{x})^2}{\sigma^2}\right\}}$$

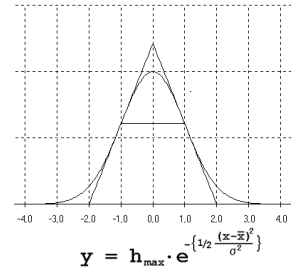
- Kurven er symmetrisk, i forhold til $(x - \bar{x}) = 0$ (toppsymmetriakse).
- Ved $0,607 h_{\max}$ er bredden 2σ ! (Det er avstanden mellom kurvens vendepunkter)
- Basisbredde $w_b = 4\sigma$
avstand av skjæringspunktene mellom basislinjen og tangentene til kurven (gjennom vendepunktene)
- "Halvbredden" $w_h = 2,354 \cdot \sigma = 2 \cdot (2 \cdot \ln 2)^{1/2} \cdot \sigma$
 $= 0,589 \cdot w_b$
 $= \frac{1}{2} \cdot (2 \cdot \ln 2)^{1/2} \cdot w_b$
 = Bredden av toppen i halv høyde av toppmaksimum;
 engelsk FWHM = Full Width at Half Maximum
 (foruten "halvbredde" (som ikke er anbefalt fordi det inviterer til feiltolkning)).

A.D.C.Skoog & al. : *F.o.An.Ch.* 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.

2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

2.B. 2. Effektivitet (innen kromatografi = sone(-ikke-)spredning)):



Effektiviteten av et kromatografisk system er systemets
 ... evne til å holde stoffet/analyttene (sonene, båndene, toppene) samlet,
 ... evne til å **hindre sonespredning**.

stor effektivitet ⇔ lite sonespredning
⇔ Smale topper (soner/bånd/flekke)
(og omvendt)

Som mål for sonespredningen kan (bl.a.) statistiske uttrykk benyttes som er utledet av Normalfordelings-toppens egenskaper, s.o., (selv om de da kalles noe annet – se nedenfor).

De ulike Mål for (kromatografisk) effektivitet nevnt her :

Forutsetter (som regel) konstante elueringsbetingelser og symmetrisk toppform (ellers nokså komplisert) .
 Beskrevet her for kolonnekromatografi.

A.D.C.Skoog & al. : F.o.An.Ch. 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.

2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

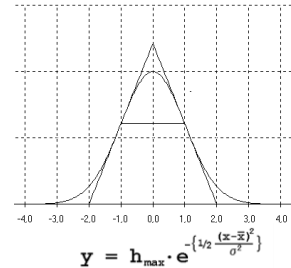
2.B. 2. Effektivitet (innen kromatografi = sone(-ikke-)spredning):

(i) **Platetall, N** (tidligere: "Antall teoretiske plater", eng.: *plate number*)

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma_t} \right)^2 \quad \text{eller tilsv. for } V_R$$

= kvadrat av retensjonstid / kvadrat av standardavvik av t_R

= invers (relativ) varians av retensjonstiden.



**Stor N $\Leftrightarrow$ stor effektivitet $\Leftrightarrow$ liten sonespredning
 $\Leftrightarrow$ smale topper**

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = \left(\frac{t_R}{w_b/4} \right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 = 8 \cdot \ln 2 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

Mest kjent form)

Forutsetter symmetriske topper.

Hvis ikke kromatografiske topper er symmetriske, "Gauss-topper"

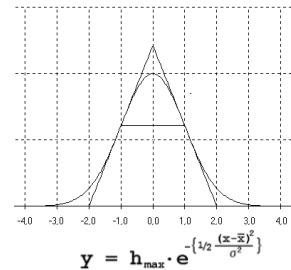
... betydelig mer komplisert for eksakt beregning av platetallet (v.h.a. beregning av s.k. "statistiske momenter") !

A.D.C.Skoog & al. : *F.o.An.Ch.* 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.

2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

2.B. 2. Effektivitet (innen kromatografi = sone(-ikke-)spredning):



(i) Platehøyden, H

(tidligere : "Høyde-Ekvivalent til en Teoretisk Plate", HETP, eng.: *plate height*)

$$H = L / N$$

L = kolonnenlengde

N = platetallet

Stor H $\Leftrightarrow$ lite effektivitet $\Leftrightarrow$ stor sonespredning $\Leftrightarrow$ brede topper

H er proporsjonalt med variansen (av molekylenes retensjonstid)

Det er også definert såkalte "effektive" parametere (N_{eff} , H_{eff}) ; de baserer seg på justerte retensjons-verdier (t'_R , V'_R). Istedenfor platehøyden, brukes noen ganger "antall plater pr. meter" (eller pr. en annen lengdeenhet) = N / L

A.D.C.Skoog & al. : *F.o.An.Ch.* 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.

2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

2.B. 2. Effektivitet (innen kromatografi = sone(-ikke-)spredning):

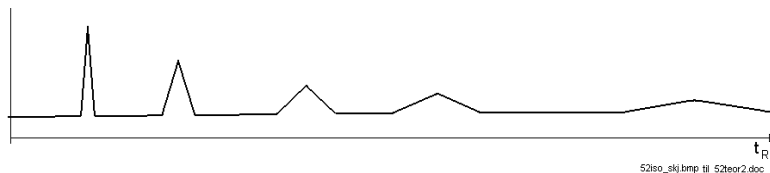
Obs. !

N og H: beskriver én topp
ved konstante elueringsbetingelser ("iso-").
varierer litt, med t_R , V_R , k , for en gitt kolonne.

Når N er (omtrent) konstant

.... da **øker bredden**, w_h (og σ), omtrent proporsjonalt **med t_R** eller V_R !

- lav t_R (eller V_R) $\Rightarrow$ smal topp,
høy t_R (eller V_R) $\Rightarrow$ bred topp.



N.B.: det finnes ikke noe fysisk inne i kolonna som tilsvarer de (teoretiske) platene !

A.D.C.Skoog & al. : *F.o.An.Ch.* 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.

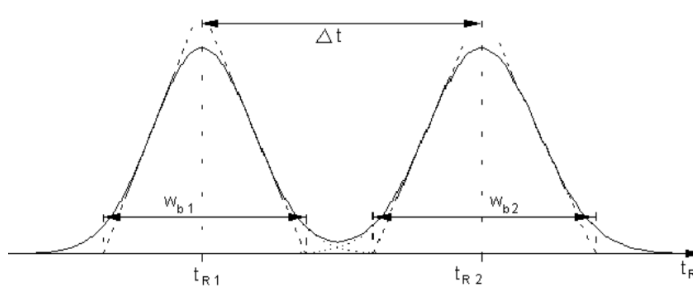
2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

2. B. 3. Oppløsning (R_s , eng.: *Resolution*) mellom topper

Kromatografi er for (separasjon av) flere enn én topp/analytt, d.v.s.

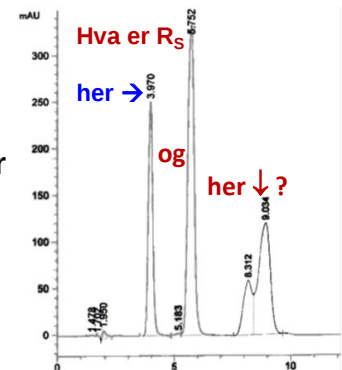
= Mål for separasjon av to topper m.h.t. deres **bredde** og **avstand** ("overlapping").



Utgengning basert på et kromatogram :

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(w_{b,1} + w_{b,2})} = \frac{\Delta t}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} \quad (= \frac{\Delta t}{0,85(w_{h,1} + w_{h,2})})$$

A.D.C.Skoog & al. : *F.o.An.Ch.* 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.



R_s for peaks 1 & 2 in Fig. is coarsely estimated to ≈ 3 ;
 R_s for peaks 3 & 4 is estimated to $\approx 0,9$

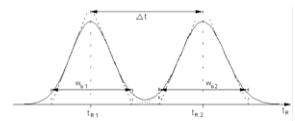
N.B.: i figuren til venstre
 ← $R_s \approx 1,33$

2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

2. B. 3. Oppløsning (R_s , eng.: *Resolution*) mellom topper

Kromatografi er for (separasjon av) flere enn én topp/analytt,



Illustrasjon av oppløsnings-tall :

$R_s = 1,0 \rightarrow$
tilsvarer ~3% areal-overlapping mellom (~ jevnstore) topper

Full **basislinje-separasjon** tilsvareer vanligvis
 $R_s = 1,5$.

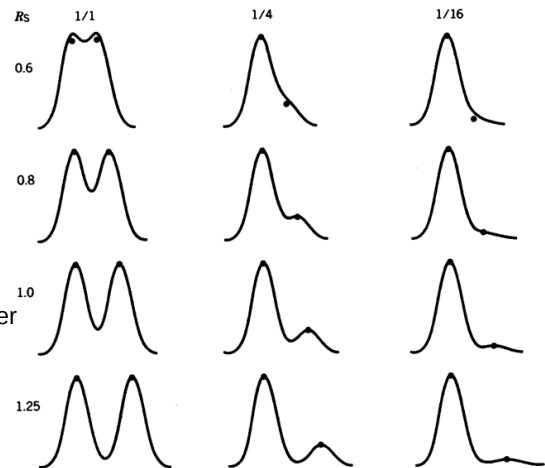
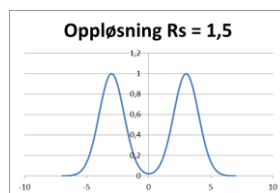


Figure 1.9. Comparison of resolution values for peaks of equal and nonequal heights. Reproduced from the *Journal of Chromatographic Science* by permission of Preston Publications, Inc.

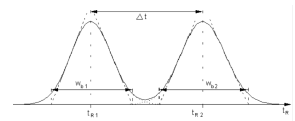
J M. Miller 'Chromatography, Concepts and Contrasts', Wiley, 2005

2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

2. B. 3. Oppløsning (R_s , eng.: *Resolution*) mellom topper

Kromatografi er for (separasjon av) flere enn én topp/analytt,



Utleddning av R_s ut fra generelle teoretiske parametere :

Uttrykker platetall (effektivitet) v.h.a. de ulike fysiko-kjemiske parametere til separasjonssystemet, som vi kjenner:

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\bar{k}}{1 + \bar{k}} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \left[= \frac{1}{4} \sqrt{N_{\text{eff}}} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right]$$

Likningen viser bidragene til R_s (kvantitativ) - blir ikke brukt til R_s -utregning

Likningen viser : R_s vokser med $N^{1/2}$
 liten $\alpha \leftrightarrow$ liten R_s
 liten $k \leftrightarrow$ liten R_s

Derfor, ...for optimering :
 øk N (lengre, bedre kolonner)
 øk α (andre SF, MF, evt. andre betingelser som øker α ellers)
 øk k (andre SF, MF evt. andre betingelser som øker k ellers)
 så mye som mulig/forsvarlig

A.D.C.Skoog & al. : *F.o.An.Ch.* 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.

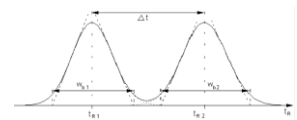
2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

2. B. 3. Oppløsning (R_s , eng.: *Resolution*) mellom topper

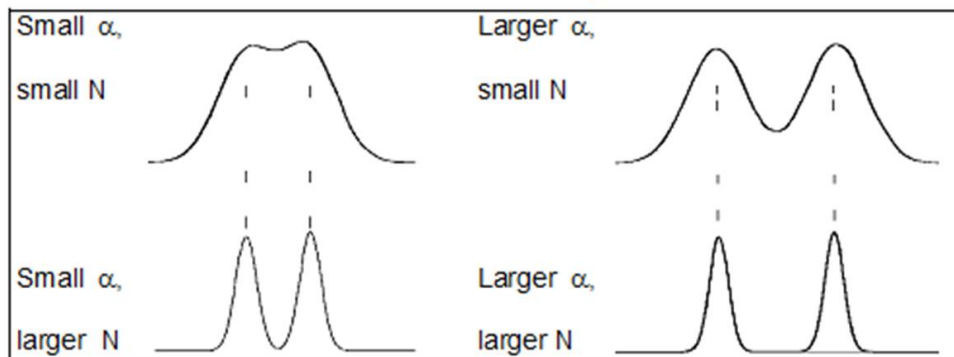
Kromatografi er for (separasjon av) flere enn én topp/analytt,

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\bar{k}}{1 + \bar{k}} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \left[= \frac{1}{4} \sqrt{N_{\text{eff}}} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right]$$



Sammenheng mellom α og R_s (hhv. separasjonstall og oppløsning) :

General overview : Relations between α and R_s :

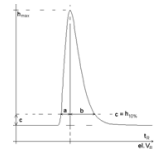


A.D.C.Skoog & al. : *F.o.An.Ch.* 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.

2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

2. B. 4. Kompliserende faktor : Asymmetri

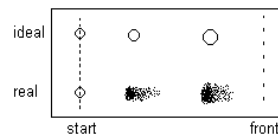
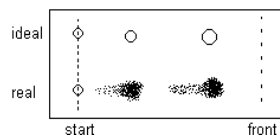


Fravik fra "Gauss"-toppens strenge symmetri !

'Tailing' (haledannelse)

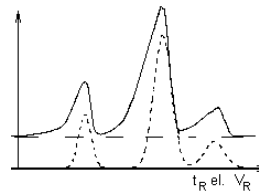
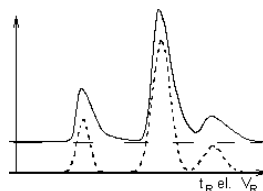
'Fronting' (= 'leading')

Planar:



← x = Lengde-akse

Kolonne:



← x = tids-akse
(el. volum-akse)

Årsak : K, fordelingskoeffisienten, varierer med konsentrasjonen av prøvekomponenten !
(Raoult's lov følges ikke.)

Dette er **meget uønsket** !

A.D.C.Skoog & al. : *F.o.An.Ch.* 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.

2. (Noe generell) Teori

2.B. Teori : Sonespredning / Båndspredning

2. B. 4. Kompliserende faktor : Asymmetri

'Dette er **meget** uønsket !

Fordi : Asymmetri gjør

- effektivitetsmålinger komplisert, (krever bruk av statistiske momenter, Reglene utarbeidet for Gauss-topper holder ikke lenger (strengt tatt).
- retensjonsparametere (t_R , R_F , V_R) prøvemengde-avhengig $\Rightarrow$ "upålitelig"
- topp-arealer (og -høyder) mindre sikkert bestemmbare (hvor starter, hvor slutter toppen ?)

Kvantitativt mål for asymmetri (empirisk) :

Asymmetri-parameter

(blant flere mulige) f.eks.:

$$A_S = b / a \quad (a, b, \text{ jfr. figuren, } c = 0,1 h_{\max})$$

For $A_S = 1,0$: symmetrisk topp

$A_S < 1,0$: fronting

$A_S > 1,0$: tailing (haledannelse)

